

بسم الله الرحمن الرحيم



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی بالینی

عنوان:

اثرات ضدسرطانی آلیسین و متیل سولفونیل متان (MSM) بر روی سلول‌های $CD44^{\pm}$

مشتق از رده سلولی سرطان سینه (MCF7)

اساتید راهنما:

دکتر نوروز نجف زاده - دکتر محمد مآذنی

استاد مشاور:

دکتر محسن ارزنلو

نگارش: الهام سرخانی

شهریور ۱۳۹۴

شماره پایان نامه:

تشکر و قدردانی

خداوند متعال را شاکرم که با لطف و کرمش در مسیر علم و دانش قدم نهادم.

مراتب سپاس و قدردانی خود را در محضر اساتید بزرگوارم، جناب آقای دکتر نوروز

نجف‌زاده و جناب آقای دکتر محمد مازنی که زحمت راهنمایی این پایان‌نامه را تقبل

نمودند، ابراز میدارم.

از زحمات استاد مشاورم، جناب آقای دکتر ارزنلو صمیمانه سپاس گزارم.

از خداوند متعال سلامتی و سربلندی برای آقای دکتر نجف زاده که راهنمایی‌های ایشان

سختی راه را بر من آسان نمود، خواستارم.

الهام سرخانی

تابستان ۹۴

تقدیم بہ

پدر و مادرم

و خانواده ی عزیزم،

بہ دلیل مہربانی، شکیبایی و ہمراہی بی نظیر و بی دریغشان..

اثرات ضدسرطانی آلیسین و متیل سولفونیل متان (MSM) بر روی سلول‌های CD44[±] مشتق از رده سلولی سرطان سینه (MCF7)

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به شیوع فراوان سرطان پستان در زنان در سراسر جهان و اهمیت کنترل رشد سلول‌های بنیادی که عامل عود و رشد تومور هستند، ما در مطالعه حاضر به بررسی اثرات جداگانه و ترکیبی متیل سولفونیل متان و آلیسین بر روی سلول‌های CD44[±] در رده‌ی سلولی سرطان پستان انسانی (MCF7) پرداختیم.

مواد و روش‌ها: سلول‌های MCF7 در محیط کشت RPMI کشت داده شده و با روش MACS سلول‌های CD44[±] جدا شدند. اثرات سمیت IC50 با روش MTT، شمارش کلونی با روش ارزیابی کلونی، توقف سیکل سلولی با روش فلوسیتومتری، درصد سلول‌های آپوپتوتیک با روش فلوسیتومتری و رنگ آمیزی آکریدین نارنجی/ اتدیوم بروماید، و بررسی مسیرهای مرگ سلولی با PCR مطالعه شدند.

نتایج: مقدار IC50 در سلول‌های CD44[±] تیمار شده MCF7 به روش MTT تعیین شد. رنگ آمیزی آکریدین اورنج- اتیدیوم بروماید نشان داد که غلظت‌های مختلف آلیسین و MSM و ترکیب این دو اثر سمیت خود را از طریق آپپتوز و نکروز اعمال می‌نمایند. بررسی مکانیزم مهار چرخه سلولی توسط فلوسیتومتری نشان گر این بود که این ترکیبات قادر به القای اثر سمیت از طریق توقف چرخه سلولی در فاز G1 می‌باشند. نتایج حاصل از PCR نشان داد آلیسن و MSM با تنظیم بیان فاکتورهای پیش آپپتوزی و ضدآپپتوزی باعث القای مرگ سلولی از طریق مسیرهای داخل سلولی و خارج سلولی می‌باشند.

نتیجه گیری: بنابراین، آلیسین و MSM و ترکیب این دو ماده توانایی القای مرگ سلولی روی سلول‌های سرطان پستان دارد و این یافته ها دیدگاه جدیدی را در زمینه استفاده از این مواد در درمان سرطان فراهم می‌آورد.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی $CD44^{+}$ ، آلیسین، متیل سولفونیل متان، سمیت سلولی

فهرست مطالب

فصل اول : طرح تحقیق

۱-۱-مقدمه	۲
۲-۱-تعریف واژگان کلیدی	۶
۳-۱-اهداف	۷
۱-۳-۱-هدف کلی	۷
۲-۳-۱-اهداف اختصاصی	۷
۳-۳-۱-اهداف کاربردی	۸
۴-۳-۱-فرضیات یا سوالات تحقیق	۸

فصل دوم : مروری بر منابع

۱-۲-سرطان	۱۰
۲-۲-سلول‌های سرطانی و آغاز سرطان	۱۱
۳-۲-چرخه سلولی	۱۲
۴-۲-میزان شیوع سرطان	۱۳
۵-۲-سرطان پستان	۱۴
۱-۵-۲-عوامل خطر سرطان پستان	۱۵
۲-۵-۲-علائم سرطان پستان	۱۷
۶-۲-سلول‌های بنیادی سرطانی	۱۸
۷-۲-مارکر بنیادی CD۴۴	۲۱

- ۲۲ CD۴۴-۱-۷-۲ و ماستاز
- ۲۳ CD۴۴-۲-۷-۲ و خودنوسازی
- ۲۳ CD۴۴-۳-۷-۲ و مقاومت دارویی
- ۲۴ CD۴۴-۴-۷-۲ و مقاومت به آپوپتوز
- ۲۵ ۸-۲-مرگ سلول: آپوپتوز و نکروز
- ۲۷ ۹-۲-آلیسین
- ۳۰ ۱۰-۲-متیل سولفونیل متان

فصل سوم: مواد و روش کار

- ۳۳ ۱-۳-نوع پژوهش
- ۳۳ ۲-۳-مواد و تجهیزات آزمایشگاهی مورد استفاده در تحقیق
- ۳۳ ۱-۲-۳-رده سلولی
- ۳۳ ۲-۲-۳-آلیسین
- ۳۳ ۳-۲-۳-متیل سولفونیل متان
- ۳۵ ۴-۲-۳-تجهیزات آزمایشگاهی
- ۳۵ ۳-۳-روش تهیه مواد مورد استفاده شده در تحقیق
- ۳۵ ۱-۳-۳-روش تهیه PBS
- ۳۶ ۲-۳-۳-روش تهیه محیط کشت RPMI-1640
- ۳۶ ۳-۳-۳-روش تهیه تریپسین-EDTA
- ۳۶ ۴-۳-۳-روش تهیه محلول DAPI
- ۳۷ ۵-۳-۳-روش تهیه رنگ MTT

- ۳۷ ۳-۳-۶- روش تهیه رنگ آکریدین اورنج/اتیدیوم بروماید
- ۳۷ ۳-۳-۷- روش تهیه رنگ کریستال ویوله
- ۳۷ ۳-۳-۸- روش تهیه ژل آگارز و بافر TBE(0.5X)
- ۳۸ ۳-۳-۹- طرز تهیه بافر EDTA(0.5M)
- ۳۸ ۳-۳-۱۰- نحوه تهیه بافر جداکننده مورد استفاده در MACS
- ۳۹ ۳-۴-۱- روش کار
- ۳۹ ۳-۴-۱- کشت سلولی
- ۳۹ ۳-۴-۲- روش انجام تکنیک MACS
- ۴۰ ۳-۴-۳- روش MTT
- ۴۱ ۳-۴-۴- روش ارزیابی کلونی
- ۴۲ ۳-۴-۵- رنگ آمیزی آکریدین اورنج/اتیدیوم بروماید
- ۴۳ ۳-۴-۶- بررسی چرخه سلولی با دستگاه فلو سیتومتری
- ۴۳ ۳-۴-۷- نسخه برداری معکوس واکنش زنجیره ای پلیمرز (RT-PCR)
- ۴۴ ۳-۴-۷-۱- استخراج RNA
- ۴۵ ۳-۴-۷-۲- تعیین غلظت RNA استخراج شده
- ۴۵ ۳-۴-۷-۳- ساخت cDNA
- ۴۶ ۳-۴-۸- RT-PCR
- ۴۶ ۳-۴-۸-۱- مواد مورد نیاز جهت انجام RT-PCR
- ۴۷ ۳-۴-۸-۲- مراحل انجام RT-PCR
- ۴۸ ۳-۴-۸-۳- الکتروفورز محصول RT-PCR

۴۸ ۳-۴-۹- ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه

۴۹ ۳-۵- آنالیز آماری

فصل چهارم: نتایج تحقیق

۵۱ ۴-۱- نتایج حاصل از تکنیک MACS

۵۲ ۴-۲- مقدار IC50 و میزان بقای سلولی

۵۳ ۴-۳- ارزیابی تعداد کلونی

۵۶ ۴-۴- رنگ آمیزی آکریدین اورنج / اتیدیوم بروماید

۵۸ ۴-۵- بررسی چرخه سلولی با دستگاه فلوسیتومتری

۶۲ ۴-۶- یافته‌های RT-PCR

۶۲ ۴-۶-۱- منحنی میزان بیان ژن P53 و Cyclin D1

۶۳ ۴-۶-۲- منحنی میزان بیان ژن Bax و Bcl-2

۶۵ ۴-۶-۳- منحنی میزان بیان ژن Caspase3

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

۶۷ ۵-۱- بحث و نتیجه گیری

۷۴ ۵-۲- محدودیت‌های مطالعه

۷۴ ۵-۳- پیشنهادات

۷۵ ۵-۴- منابع

۸۰ ۵-۵- چکیده انگلیسی

فهرست جداول و نمودارها

جدول ۱-۳- توالی ژنهای مورد بررسی در مطالعه	۳۸
جدول ۱-۴- مقادیر IC_{50} بدست آمده از تیمار سلول ها با آلیسین و MSM	۵۳
جدول ۲-۴- درصد سلول های زنده، آپوپتوتیک و نکروتیک	۵۷
جدول ۳-۴- درصد سلول های در فازهای G_1 ، S ، G_2M	۵۹
نمودار ۱-۴- نمودار سلول ها در فازهای G_1 ، S ، G_2M در سلول های $CD44^+$	۶۰
نمودار ۲-۴- نمودار سلول ها در فازهای G_1 ، S ، G_2M در سلول های $CD44^-$	۶۱
نمودار ۳-۴- نمودار بیان کمی ژن $P53$	۶۳
نمودار ۴-۴- نمودار بیان کمی ژن $Cyclin D1$	۶۳
نمودار ۵-۴- نمودار بیان کمی ژن Bax	۶۴
نمودار ۶-۴- نمودار بیان کمی ژن $Bcl-2$	۶۵
نمودار ۷-۴- نمودار بیان کمی ژن $Caspase3$	۶۵
فرمول ۱-۳	۴۱

فهرست شکل ها

- شکل ۱-۲- خودنوسازی در سلول های بنیادی سرطانی ۲۰
- شکل ۲-۲- اصول درمان در سلول های بنیادی سرطانی ۲۰
- شکل ۳-۲- ساختار ژن و پروتئین CD۴۴ ۲۱
- شکل ۱-۳- تصویر سلول های MCF7 کشت داده شده ۳۳
- شکل ۲-۳- ساختار مولکولی آلیسین ۳۳
- شکل ۳-۳- ساختار مولکولی متیل سولفونیل متان ۳۳
- شکل ۱-۴- سلول های CD۴۴⁺ بدست آمده با روش MACS ۵۱
- شکل ۲-۴- میزان بقای سلولی بدست آمده از تیمار سلول ها با آلیسین و MSM ۵۴
- شکل ۳-۴- تاثیر غلظت های مختلف آلیسین و MSM روی کلونی زایی CD۴۴⁺ ۵۵
- شکل ۴-۴- تاثیر غلظت های مختلف آلیسین و MSM روی کلونی زایی CD۴۴⁻ ۵۵
- شکل ۵-۴- رنگ آمیزی آکریدین اورنج / اتیدیوم بروماید سلول های CD۴۴[±] ۵۸
- شکل ۶-۴- الگوی بیان ژنی ژن های P53 و Cyclin D1 ۶۲
- شکل ۷-۴- الگوی بیان ژنی ژن های Bax و Bcl-2 ۶۴
- شکل ۸-۴- الگوی بیان ژنی ژن های Caspase3 ۶۵

فهرست اختصارات

BP: Binding_Protein

CD: Cluster Of Differentiation

CPK: Cyclin Dependent Kinase

CSC: Cancer Stem Cell

DAD: Diallyl Disulfide

DMSO: Dimethyl sulfoxide

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

GSH: Glutathione

HA: Hyaluronic acid

IAP: inhibitors of apoptosis

IC50: a measure of how effective a drug is

MSM: methyl sulfonyl methane

MACS: Magnetic Cell Isolation and Cell Separation

OD: Absorbed dose

PCR: polymerase chain reaction

PS: phosphatidylserine

UV: Ultrav